

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1933

N° 20

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1933

PAR

André BERGUET

Né le 23 Mars 1908, à BOLOGNE (Haute-Marne)

**Sur la Thérapeutique
par les Matières Colorantes**

**Recherches sur l'action antiseptique et empêchante
de quelques matières colorantes**

JURY

Président : M. LÉPER, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. PANISSET.
M. NICOLAS.

} Professeurs à l'Ecole Nationale Vétéri-
naire d'Alfort.

PARIS

VIGOT FRERES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1933

**SUR LA THÉRAPEUTIQUE
PAR LES MATIÈRES COLORANTES**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1933

N° 20

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1933

PAR

André BERGUET

Né le 23 Mars 1908, à BOLOGNE (Haute-Marne)

Sur la Thérapeutique
par les Matières Colorantes

Recherches sur l'action antiseptique et empêchante
de quelques matières colorantes

JURY

Président : M. LÆPER, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. PANISSET.
M. NICOLAS.

{ Professeurs à l'Ecole Nationale Vétéri-
naire d'Alfort.

PARIS

VIGOT FRERES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1933

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire
des Ecoles Vétérinaires, P.-J. CADIOT, H. VALLÉE.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques.....	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et Chimie médicales, toxicologie, pharmacie.	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique ; Zoologie	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique ; sémiologie et propédeutique, jurispru- dence	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale, médecine opéra- toire et ferrure.....	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique ; médecine opératoire, obstétrique.....	LESBOUYRIES.
Pathologie générale et microbiologie, maladies micro- biennes et police sanitaire, clinique.....	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique ; autopsies	PETIT.
Zootecnie et économie rurale.....	DECHAMBRE
Agronomie, botanique et hygiène ; matière médicale..	} DECHAMBRE et HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale...	
	VERGE.

Professeur agrégé : M. LESBOUYRIES

Chef de travaux agrégé : M. SIMONNET

Chefs de travaux :

MM. MONVOISIN, MOUSSU (R.), GORET, VALADE, BRION, BERTHELON.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



AUX MIENS

A MES AMIS

A MES MAITRES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LÉPER

Qui nous a fait le grand honneur
de présider cette thèse, hommage de
nos sentiments respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

Hommage de notre profonde re-
connaissance et de nos sincères
remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR NICOLAS

Hommage de nos sentiments res-
pectueux.

SUR LA THÉRAPEUTIQUE

PAR LES MATIÈRES COLORANTES

INTRODUCTION

Sur les conseils de M. le Professeur Panisset, nous avons choisi pour couronner nos études de médecine vétérinaire, un sujet de thèse sur une des grandes questions à l'ordre du jour depuis quelques années : l'emploi des matières colorantes en thérapeutique. La théorie d'Ehrlich assimilant le médicament à une teinture a été à la base de l'étude des colorants ; c'est de cette dernière qu'est née la chimiothérapie à base de matières colorantes.

Avant d'entrer dans l'exposition de notre travail qu'il nous soit permis d'adresser à M. le Professeur Panisset nos sincères remerciements pour la bienveillance qu'il nous a témoignée. Je remercie également M. le Professeur Nicolas pour la complaisance avec laquelle il nous a accueilli ; M. le Professeur Verge qui a bien voulu nous documenter dans un chapitre de notre thèse ; le vétérinaire commandant Marcenac pour son obligeance à favoriser nos recherches bibliographiques. Grâce au cordial appui de M. Goret, chef de travaux de bactériologie, les manipulations que nous avons à faire se sont trouvées facilitées, qu'il trouve ici l'assurance de mes meilleurs remerciements.

Nous assurons tous nos maîtres de l'Ecole d'Alfort de notre profonde reconnaissance pour l'excellent enseignement et les conseils qu'ils nous ont prodigués.

CHAPITRE PREMIER

La chimiothérapie

Sous le nom de microbes on désigne des êtres infiniment petits qui, pour être vus, demandent l'emploi du microscope : ce sont des microorganismes. La bactériologie en connaît un grand nombre, germes très diversifiés qui doivent être classés en deux grandes catégories appartenant :

1° Au règne animal : ce sont les protozoaires, spirochètes, etc...

2° Au règne végétal : ce sont les bactéries.

Dans les deux cas ce sont des êtres constitués par une seule cellule, ou, quand il y en a plusieurs, ce sont des cellules identiques et juxtaposées. Ces infiniment petits, lorsqu'ils pénètrent dans un organisme, sont capables, les uns par leur pullulation, les autres par l'élaboration de toxines, de produire des troubles extrêmement graves soit à l'organisme entier, soit à un appareil isolé.

Aussi, depuis que l'homme existe et qu'avec lui la maladie est apparue, s'est-il efforcé de se soustraire à son atteinte. Dès les temps les plus reculés, l'homme, comme la bête, chercha dans les plantes des vertus curatives par l'ingestion ou l'application sur les plaies. Plus tard on incrimina les mauvais génies et le traitement des malades se faisait par des incantations et des immolations aux divinités dans le but d'éloigner les sources de souffrance de la demeure des patients. Les propriétés bienfaisantes des plantes réapparurent encore, et elles étaient employées sans chercher à connaître les principes actifs qui provo-

quaient la guérison. L'empirisme continua avec l'ère des substances chimiques et parce que telle substance était efficace à l'égard de telle maladie, on ne cherchait pas à en extraire le mécanisme. Mais la découverte des agents mêmes de la maladie ouvrit le champ à l'expérimentation ; de nombreuses expériences virent le jour et amenèrent la sélectivité des médicaments.

Aujourd'hui la médication chimique est à la recherche d'agents capables de détruire les microbes pathogènes sans porter atteintes aux cellules de l'organisme. De symptomatique qu'elle était, elle est devenue étiologique.

Contre les maladies microbiennes les travaux de Pasteur opposèrent la sérothérapie, la vaccinothérapie, contre le charbon, contre la rage : action préventive contre les unes, action thérapeutique contre les autres. Mais toutes les maladies infectieuses ne sont pas justiciables du même traitement et c'est ainsi qu'actuellement la vaccinothérapie et la sérothérapie sont sans effet dans les maladies à protozoaires.

La découverte des bactéries, la nécessité de chercher pour les maladies à protozoaires d'autres remèdes que les vaccins et les sérums, ont amené le développement de la chimie et on peut dire actuellement que la chimie est liée à la thérapeutique : c'est la chimiothérapie qui est la thérapeutique étiologique des maladies par l'emploi de substances chimiques parfaitement définies agissant à la façon d'antiseptiques internes. On crut, à la suite de l'action antiseptique *in vitro* de certaines substances médicamenteuses, pouvoir les injecter impunément dans l'organisme animal ; c'est ainsi que Koch essaya d'employer le sublimé dans le traitement d'animaux atteints de fièvre charbonneuse ; les résultats ne confirmèrent pas les espoirs mis en la valeur de ces agents. Toutefois ces échecs ne découragèrent pas les chercheurs et par tâtonnements et expériences on étudia la plupart des antiseptiques dans leur action sur les germes infectieux.

Cette science de l'antisepsie interne a pour but de

débarrasser l'organisme infecté ou infesté des germes qui y ont pénétré, de s'opposer en certains cas à l'infection possible, manifestant ainsi une double tendance : curative et prophylactique. Elle part de cette idée que les méthodes d'antisepsie nées de la vaccinothérapie et de la sérothérapie se montrent souvent insuffisantes à l'égard de germes parfaitement organisés et elle se propose d'user des médicaments chimiques à la façon des anticorps dont l'action est monotrope, en laissant l'organisme intact et n'atteignant que le germe.

Nous savons que cette thérapeutique est possible, puisque la stérilisation d'un organisme infecté ou infesté s'est trouvée réalisée dans la guérison, ou tout au moins, dans l'atténuation de certaines infections de l'homme et des animaux. C'est ainsi que l'on traite la syphilis par les sels de mercure, de bismuth, d'arsenic, le paludisme par la quinine et les arsenicaux (stovarsol), les trypanosomiasés par les arsenicaux (atoxyl), le 309, les dysenteries amibiennes par l'émétine, etc. ; et que dans un but prophylactique on pratique la quinzisation, l'arsénisation préventives.

Elle est bien une thérapeutique étiologique puisqu'elle lutte contre des maladies dont la cause occasionnelle nous est parfaitement connue, et spécifique puisqu'elle atteint l'agent causal sans nuire à la cellule organique.

Les résultats obtenus jusqu'ici, résultats remarquables, il est vrai, l'ont été sur des microbes provenant du règne animal. Dans la lutte contre les bactéries, dont la morphologie est très éloignée de celle des protozoaires, la chimiothérapie *in vivo* ne nous a offert que des résultats douteux et c'est pourquoi Florence écrit :

« Si au point de vue théorique ces derniers offrent un très grand intérêt et qui autorise tous les espoirs, il est par contre certain, qu'au point de vue pratique, le problème reste entier. Toutes les conquêtes dans ce domaine sont du ressort de la sérologie ; au point de vue chimique, c'est là un des champs les plus vastes qui restent ouverts à la recherche ». Actuellement nul ne peut s'élever contre les

paroles de cet auteur tant il est vrai qu'en ce qui concerne les maladies infectieuses leur traitement par la chimiothérapie est encore presque tout entier à instituer ; sur ce terrain les médicaments chimiques sont au stade d'expérimentation.

Si avec certains microbes on peut arriver à immuniser les animaux par les vaccins et sérums, par contre avec des microbes extrêmement virulents, injectés même en très petite quantité, on n'obtient pas l'immunité. Actuellement nous avons encore un grand nombre de maladies dont les agents excessivement virulents n'ont pu être atténués malgré les nombreux agents mis en œuvre. Aussi on recherche des médicaments actifs contre les maladies microbiennes à la façon des substances chimiques employées dans le traitement des infestations parasitaires. La chimie nous fournit une grande quantité de corps et parmi eux les colorants.

Les colorants ont été beaucoup employés en médecine expérimentale ; les remèdes ont été essayés comme on varie les teintures et souvent la chimiothérapie a été une chromothérapie. C'est qu'avant la découverte des matières colorantes artificielles, on n'utilisait dans les préparations tinctoriales que certains colorants naturels (carmin, safran).

Mais depuis l'apparition des matières colorantes organiques, celles-ci furent largement utilisées dans leurs applications tinctoriales. A la longue par leur emploi quotidien, de nouvelles actions étrangères à la teinture étaient observées ; l'une d'elles est l'action antiseptique à l'égard de certains microbes, aperçue au cours des préparations microbiennes.

Ces diverses propriétés des colorants donnèrent lieu à des applications dans lesquelles ils furent employés soit en tant que substances organiques colorées, soit comme substances organiques particulières dont la couleur n'entre pas en ligne de compte. Ils ont contribué à l'étude des structures histologiques, des structures de la molécule chimique et de leurs variations ; ils ont permis de connaître

la morphologie des microbes et depuis ils sont passés dans le domaine de la thérapeutique.

Cette application des colorants dans une branche qui ne semblait pas être la leur n'est que le résultat de l'évolution de la science de guérir. Depuis le développement de la physiologie expérimentale instituée par Claude Bernard le médicament a pu être étudié dans son action. La physique et la chimie ont permis d'établir la composition des substances que l'empirisme montrait agir comme médicaments, d'isoler des fonctions et des groupements actifs, de construire des corps chimiques nouveaux. Par la connaissance de ces groupements actifs le chimiste peut prévoir les propriétés thérapeutiques d'un composé dont il a la formule.

Actuellement il faut s'orienter vers une médication spécifique, considérer celle-ci comme une teinture. « Guérir une maladie, c'est trouver un composé chimique qui colore le microbe de cette maladie sans colorer les cellules de l'organisme ». L'idée d'Ehrlich a été de « teindre spécifiquement un microbe ». C'est pourquoi l'étude des matières colorantes revêt une si grande importance.

La méthode de travail en chimiothérapie consiste à associer les résultats obtenus *in vitro* avec les expériences faites sur le vivant de l'animal, étudier les observations des produits *in vitro* et *in vivo* et les comparer aux réactions de la chimie organique, associer la technique des chimistes et les expériences *in vivo* des biologistes.

CHAPITRE II

Du choix des matières colorantes par l'expérimentation

Au premier abord il peut sembler bizarre que les matières colorantes puissent avoir d'autres applications que celle que leur confère leur propriété tinctoriale. On est en droit de se demander pourquoi les colorants employés d'abord dans l'industrie de la teinture, sont passés aujourd'hui dans le domaine de la thérapeutique. En réalité cela n'a rien d'étonnant ; la théorie d'Ehrlich assimilant le médicament à une teinture, il était normal d'essayer les colorants en thérapeutique. Mais en même temps cette évolution puise son développement dans plusieurs sources parmi lesquelles nous citerons :

- le développement de l'industrie chimique,
- la déficience des sérums et vaccins dont l'emploi n'est pas généralisé, ou n'a pu l'être, à toutes les maladies,
- la toxicité de certaines substances médicamenteuses,
- la découverte des propriétés antiseptiques des colorants.

L'industrie chimique, par son énorme extension, a apporté dans ce domaine une large contribution par le nombre illimité de matières colorantes qui sont nées d'elle ou de l'extraction des matériaux qu'elle traitait.

L'insuffisance des vaccins et sérums ne fait pas de doute. Quoique la majeure partie des infections microbiennes peut être traitée par la sérothérapie et la vaccinothérapie, il n'en est pas moins vrai qu'il en existe encore en assez grand nombre auxquelles cette méthode n'est pas applica-

ble et qui justifie les recherches effectuées en chimiothérapie. Dans ces dernières affections les anticorps sont inconnus ou absents et par conséquent on ne peut obtenir l'immunité vis-à-vis d'elles. Comme nous l'avons dit au chapitre précédent cette prophylaxie préventive est cependant possible « chimiothérapiquement » : quinzisation, arsénisation... On dira qu'elle est de courte durée et qu'elle nécessite des renouvellements fréquents. N'en est-il pas de même pour la plupart des vaccins qui ne confèrent qu'une immunité limitée et dont l'emploi est réservé pour les périodes d'infection imminente. Et au cas où ils seraient défailants ne serait-il pas souhaitable d'avoir à sa disposition une médication efficace ?

Mais dans cette médication à base d'agents chimiques on s'est heurté à une grosse difficulté : la toxicité ; avec ce traitement on aboutissait à la mort du malade et des microbes, ou alors les doses employées étaient si faibles que les germes n'étaient pas atteints. Il n'y avait aucune spécificité du médicament qui se fixait également sur les parties communes aux microbes et aux cellules.

Ces deux facteurs provoquèrent des recherches nombreuses sur la plupart des agents chimiques lorsque fut découverte l'action antiseptique des matières colorantes. On remarqua dans les préparations microbiologiques que les germes colorés n'étaient plus capables de se développer. De là, à l'utilisation des matières colorantes dans le traitement des maladies infectieuses, il n'y avait qu'un pas. Il fut franchi par Ehrlich et Shiga qui, en 1904, utilisèrent le trypanroth dans le traitement des trypanosomiasés et l'on peut dire que de leurs essais naquit la chromothérapie. Dans cette branche la voie était ouverte aux chercheurs et nombreux furent ceux qui y apportèrent leur contribution. C'est ainsi que Wendelstaedt étudia les couleurs dérivées du triphénylméthane et que Nicolle et Mesnil firent d'importants travaux dans le groupe de la benzidine. La liste des matières colorantes est très étendue et se répand en plusieurs catégories ; mais toutes

n'ont pas été essayées en thérapeutique et restent encore dans le domaine de l'histochimie. Peut-être de cette foule d'anonymes sortira-t-il un jour des médications inespérées. Pour notre part nous n'avons en vue dans notre travail que des produits dont l'action s'est montrée certaine, chacun dans leur catégorie.

Ehrlich et Shiga eurent les premiers l'idée d'employer les matières colorantes comme agents antimicrobiens à la suite des travaux de Witt sur les relations existant chez celles-là entre la constitution physico-chimique et les propriétés physiologiques. Ils injectèrent à des souris, atteintes de trypanosomiase, un colorant qu'ils venaient de découvrir : le trypanroth et constatèrent ses effets trypanicides. Nicolle et Mesnil, à leur tour, obtinrent le trypan bleu, corps du même type, mais plus actif encore que le trypan rouge. Sans doute la chromothérapie aurait-elle pris un développement plus considérable si la découverte de l'atoxyl n'était venue arrêter son essor. Mais cette action *in vivo* des colorants vis-à-vis des microbes parasites du règne végétal, avait d'abord été remarquée *in vitro* à l'égard des microbes proprement dits ou bactéries : Kremiansky, Stilling, Behring avaient déjà étudié l'action antimicrobienne des matières colorantes. Dans la suite, Digralski, Simon et Wood, Kliegler, Bridré, Churchmann, Burke et Skinner, ont fait des études plus approfondies de la question. Malassez disait déjà que les microbes teints par les colorants d'aniline, pour les étudier au microscope, sont tués et ne présentent plus le pouvoir de se reproduire. De ces résultats est partie la recherche des doses infertilisantes et des doses mortelles, de la constitution, puis de la thérapeutique par les matières colorantes. Aujourd'hui la chromothérapie semble prendre un nouveau développement.

La bactériologie et l'histologie montrent qu'il est possible de colorer les microbes et les cellules ; c'est ainsi que l'on dit couramment que tel microbe prend le Gram, que tel autre prend le Ziehl, indiquant ainsi la fixation

élective des colorants sur tel ou tel microbe. En histologie on teint des coupes de tissu pour en étudier la constitution. Pour atteindre les microbes il fallait trouver des médicaments venant se fixer sur le germe à la façon d'une teinture. Pourquoi, dans ce cas, ne pas utiliser les colorants, leur fixation étant signe d'action ? Pour les employer dans ce but il fallait étudier la constitution chimique des colorants et celle des organes au contact desquels ils étaient appelés; en déduire de là l'activité présumée sur l'organisme et sur l'hôte infectant. Les microbes sont tous constitués de matières albuminoïdes, principalement de nucléines, corps acides composant le protoplasma microbien. Les mettant en présence des substances basiques, on devait obtenir des composés ne manifestant plus d'action sur l'organisme. Se basant sur ces données, Ehrlich, étudiant la composition des colorants, les divisa en trois groupes :

les colorants basiques dont le principe colorant est une base combinée à un acide incolore,

les colorants acides possédant un acide combiné à une base, incolore ou non,

les colorants neutres.

On conçoit que les couleurs basiques aurent tendance à s'unir aux acides, tandis que les couleurs acides satureront leur acidité aux dépens des sels alcalino-terreux ou ammoniacaux qui entrent pour une grande part dans la composition de certains tissus (fibrine stroma globulaire).

Quelles conditions doivent donc remplir les matières colorantes pour pouvoir être appliquées à la thérapeutique ? Celle-ci vise la lutte contre l'infection et l'infestation ; elle cherche à débarrasser l'organisme de ses hôtes envahissant sans toucher à ses cellules. Or beaucoup de médicaments chimiques atteignent à la fois les deux, organisme et germe, et ne sont d'aucune application puisqu'à leur tour ils sont la cause de perturbations organiques. Il faut que les substances utilisées ne possèdent pas ces deux actions simultanément, mais que l'action sur le

germe soit la plus prononcée que l'autre, sans quoi nous employons des corps qui n'ont pas d'électivité et qui sont des poisons d'organes puisque l'action organotrope égale ou dépasse l'action parasitotrope. « Ces corps se fixent sur les protoplasmes, sur les parties communes aux parasites et aux cellules, précipitent, coagulent les albuminoïdes et sont bloqués par elles » (Nicolas). Il faut, au contraire, choisir des médicaments aussi peu organotropes que possible, des médicaments spécifiques capables de tuer l'organisme visé ou constituer un milieu susceptible d'arrêter son développement, sans porter atteinte à l'intégrité des cellules dans lesquelles il vit. « De telles substances peuvent exister en raison de la différence de constitution qui sépare les parasites des cellules et la présence chez les premiers d'éléments spécifiques qui les caractérisent, différence démontrée par ce fait que, par exemple, les sels de Pb, H.C.N, AS^2O^3 , etc., très toxiques pour les organismes animaux supérieurs, le sont moins pour les bactéries ». Ces substances, en outre, doivent être capables de traverser la membrane protectrice que possèdent les microbes.

Dans le domaine des colorants on conçoit que ces actions seront d'autant mieux remplies que ceux-ci seront plus basiques, ils se fixeront mieux sur les microbes et seront donc d'autant moins toxiques pour l'organisme. Au contact des germes il y aura en présence des acides et des bases qui donneront des combinaisons non toxiques. Le protoplasma microbien est constitué presque exclusivement par de la substance nucléaire et de l'acide métaphosphorique ; il se combinera avec la base colorante des couleurs basiques, formant des combinaisons d'autant plus stables que l'albuminoïde sera plus acide. Le choix des colorants basiques se trouverait donc bien justifié.

D'autre part, l'activité physiologique d'une substance étant liée à son état de division au sein d'un solvant, il est juste de penser que la même propriété peut être conférée aux colorants. Des recherches de Biltz, Freundlich

et Heumann, Pignon sur la dialyse des colorants à travers les membranes, ont permis de dire que les systèmes où la matière dissoute est fractionnée jusqu'à la molécule sont les plus actives. « La notion de colloïde ne saurait être étrangère au pouvoir microbicide ». Ces substances sont adsorbées par les microbes et réalisent des combinaisons chimiques nouvelles de nature inconnue, qui provoquent des perturbations dans les phénomènes physiologiques après une courte phase d'inactivité.

Pour être efficace il faut que la substance agisse rapidement ; la vitesse sera une des conditions du succès ; elle doit agir avant l'apparition des réactions que la cellule opposera à la matière étrangère. Les microbes possèdent pour lutter contre l'action des corps étrangers des membranes plus ou moins épaisses, de constitution variable. La vitesse est donc fonction du degré de solubilité dans les couches qui renferment le protoplasma microbien. Pour cette raison il est parfois utile d'adapter aux médicaments des véhicules qui réalisent au mieux les conditions d'osmose et de diffusion pour traverser les couches protectrices, entraînant avec eux la substance que l'on met en œuvre dans la lutte contre l'agent microbien. Donc vitesse d'action, solubilité dans les couches protectrices sont deux gros facteurs de l'action microbicide des colorants thérapeutiques.

Nous savons encore que tous les microbes vivants ne se laissent pas colorer. Une des conditions de succès sera de pouvoir colorer les germes vivants, et, l'expérimentation a montré qu'on trouvait le plus grand nombre de colorants vitaux parmi les colorants basiques.

D'autre part, des substances actives in vitro ne le sont pas forcément in vivo et réciproquement. Il faudra essayer d'amener le produit étudié in vitro tel quel au contact des germes ou, au contraire, compter sur la désintégration de la matière colorante avant son arrivée au contact de ce que l'on veut atteindre.

Au début de l'étude du pouvoir antiseptique des colo-

rants les auteurs n'examinèrent pas à la fois la nature du germe et la structure de la matière colorante employée. C'est à Kriegler que l'on doit les premières recherches systématiques sur les relations entre la structure et le pouvoir antiseptique des matières colorantes. Cet auteur est « vraisemblablement le premier à mettre en œuvre des groupes de colorants dont il essaie de déterminer la formule ». Certes, il ne s'est pas attaché à rechercher les diverses concentrations et à étudier les phénomènes consécutifs, il s'est surtout occupé du contact nécessaire entre colorant et germe pour arriver à la mort de celui-ci. Mais toutefois il a fait ressortir un point capital, à savoir qu'une matière colorante est d'autant plus antiseptique que son caractère basique est plus marqué.

Eisenberg ayant travaillé sur plus de 100 colorants a rapproché les propriétés colorantes et antiseptiques de ces substances du caractère basique. Isabolizsky et Smoljan effectuèrent également de nombreux travaux et ils en conclurent que les couleurs basiques sont beaucoup plus antiseptiques que les couleurs acides, lesquelles ne le sont pas ou peu.

Ainsi l'expérimentation a permis de dire qu'il fallait choisir des colorants spécifiques pouvant atteindre parasites et microbes sans léser ni les cellules, ni les tissus organiques, sans quoi ils deviennent des poisons inutilisables. Il faut que leur coefficient thérapeutique soit faible, c'est-à-dire que le rapport entre la dose tolérée et la dose curative soit très élevé; ce colorant sera d'autant plus antiseptique que sa dose mortelle sera moins élevée. Ces colorants doivent également jouir de la propriété de colorer les microbes vivants : il faut des colorants vitaux, c'est-à-dire qu'ils puissent pénétrer dans les cellules vivantes grâce à leur solubilité dans les lipoides cellulaires. Or c'est dans les colorants basiques, à part quelques couleurs acides pourvues de groupements qui leur confèrent l'électivité, que l'on doit chercher des substances thérapeutiques efficaces et non toxiques.

CHAPITRE III

Du mécanisme d'action des matières colorantes

Constitution générale des colorants

Quand on étudie les effets d'une substance quelconque, il est en premier lieu nécessaire d'établir sa constitution. Qu'est-ce donc qu'un colorant ? C'est un corps coloré qui peut communiquer sa coloration à d'autres corps et qui possède la propriété d'exercer sur la lumière une absorption sélective. La couleur est régie par certains groupements nommés « chromophores », groupes qui apportent la coloration aux molécules qui les contiennent et qui, normalement, ne sont pas saturés. Les substances qui renferment les chromophores sont appelées « chromogènes » ; ceux-ci bien qu'étant colorés, ne sont pas obligatoirement colorants. Pour le devenir il faut leur introduire des groupements salifiables acides ou basiques ($\text{OH} - \text{NH}^2$) appelés « auxochromes » qui exaltent la coloration et confèrent le pouvoir tinctorial. Le colorant est donc un chromogène pourvu de groupements salifiables fixateurs.

Mécanisme

La notion d'affinité spécifique de certains médicaments chimiques pour la cellule animale a amené l'étude des relations existant entre la constitution physico-chimique de substances médicamenteuses et leurs propriétés physiologiques. Dès 1876, Witt avait montré leur existence, mais c'est surtout à Ehrlich et Schiga, Nicolle et Mesnil que l'on doit les travaux les plus importants. Ehrlich disait que chez la matière colorante et le type d'organisme sur lequel elle réagissait, il existait des groupes capables de s'accrocher. Tant que ces groupes restaient éloignés l'un de l'autre il ne pouvait rien se passer, mais une fois le contact, il s'établissait une molécule complexe apte à déclencher une action thérapeutique spéciale. Les fibres animales étaient supposées renfermer des groupements tels que NH^2 et OH , susceptibles d'être salifiés par des groupements, acides ou basiques, des colorants, déterminant ainsi la fixation du colorant sur la fibre, autrement dit sa teinture. Cela résulte de la composition du colorant et de l'organisme dans lequel il est introduit. Par analogie on pouvait donc admettre que dans les substances médicamenteuses il existait des groupes dits « pharmacophores » dont la conjugaison avec d'autres groupes, contenus dans les éléments cellulaires, donne des corps nouveaux à propriétés thérapeutiques particulières, agissant à la manière des colorants qui, au contact des fibres animales, leur donnent une nouvelle propriété : la couleur. C'est la conception d'Ehrlich qui assimile le médicament à un colorant qui « se fixerait comme le colorant sur la fibre d'une manière spécifique qui tient à ce que sa constitution répond à celle du germe qu'il imprègne ». C'est donc en quelque sorte de la chromothérapie.

Pour qu'une substance agisse sur une cellule, cellule d'organe ou cellule microbienne, il faut qu'elle se fixe sur

le protoplasma. L'action du colorant est intimement liée à sa fixation sur les germes ou sur les tissus : « *Corpora non agunt nisi fixata* », a écrit Ehrlich. Cette fixation est liée elle-même à la présence dans la molécule médicamenteuse de certains groupements qui changent avec le germe à atteindre et l'action qui en résulte dépend d'un corps complexe nouvellement formé entre la matière colorante et les constituants chimiques des matériaux cellulaires organiques.

Mais peut-on dire qu'une substance dépourvue d'action dans l'expérimentation *in vitro* se montrera inefficace une fois introduite dans l'organisme ? Un corps antiseptique *in vitro* le sera-t-il forcément *in vivo* ? Evidemment non, et c'est ainsi que le trypan rouge, qui ne montre aucune action trypanicide *in vitro*, est actif *in vivo*, que les dérivés de la quinine actifs *in vitro* à l'égard des cocci n'ont presque plus d'action sur ces germes lorsqu'ils sont introduits dans l'organisme infecté. Ainsi le médicament, comme la matière colorante, agit soit d'elle-même par sa constitution propre, soit en occasionnant la formation d'un autre corps qui est actif ; il se constitue un composé nouveau auquel sont liées les fonctions thérapeutiques.

Nous connaissons les corps que nous utilisons, nous connaissons leurs propriétés ; leurs molécules sont formées d'un noyau sur lequel se greffent des groupes atomiques secondaires ; c'est en substituant, en déplaçant ces groupes, que l'on constate la propriété attachée à chacun de ces groupements ; par l'expérimentation on étudie les propriétés de ces nouveaux composés et les rapports entre la constitution moléculaire et l'action thérapeutique. Par les associations médicamenteuses on arrive à obtenir, *in vivo*, des actions invisibles ou nulles dans les tubes du laboratoire.

Pour arriver à tuer le germe il faut que la matière colorante l'imprègne, comme elle imprègne le tissu animal ou la fibre végétal ; elle agit donc ici conformément aux lois physico-chimiques qui régissent les phénomènes d'ab-

sorption et d'osmose. Les corps microbiens fixent la matière colorante soit par simple adhésion ou adsorption, tantôt les substances très complexes qui les constituent agissent à la façon de membranes qui laissent diffuser les colorants vers les colloïdes intra-cellulaires sur lesquels ils exercent des actions très diversifiées. Mais ces matières colorantes se fixent plus ou moins bien sur les éléments, phénomène qui tient à la constitution de ces derniers : il y a une question d'affinité élective et la couleur se fixe sur les germes à la façon de telle couleur qui prend sur la cellule nerveuse, telle autre sur la graisse ; par exemple, le bleu de méthylène marque une affinité spéciale pour les fibres nerveuses vivantes, laissant, dans un organisme, les autres parfaitement indifférentes à son action. La réaction qui se produit au contact des germes et des colorants varie avec chaque microorganisme et avec chaque matière colorante ; les colorants sont plus ou moins spécifiques et cette propriété tient à la présence dans leur composition de certains groupements.

Quelle est la nature chimique de ces groupements qui confèrent aux colorants l'action antiseptique dont ils jouissent ? D'après Fairbrother et Renshaw les colorants qui possèdent cette action contiennent un ou plusieurs groupes amine (NH^2) dans leur molécule ; cependant la présence de ces groupes n'est pas suffisante pour donner ce pouvoir microbicide quoique leur absence suffise à l'empêcher. De même l'adjonction d'autres groupes, sulfonés, nitrés, par exemple, est capable de modifier ou de suspendre les propriétés antiseptiques des colorants ou leur emploi par des modifications dans la toxicité. Aussi les variations dans la constitution chimique de substances qui appartiennent à la même classe s'accompagnent de modifications dans l'effet physiologique, et l'addition ou la suppression de certains groupements dans des substances diverses peuvent les transformer en corps actifs ou inactifs.

Mais la chimie n'est pas seule à conditionner l'action antiseptique des colorants. Il y a plusieurs facteurs qui influencent ce pouvoir et parmi eux on peut citer :

1° L'état de division au sein d'un solvant. Chaque corps, en effet, est capable d'acquérir des propriétés particulières suivant son état de division au milieu d'un solvant donné.

2° Le PH, dont l'influence est indéniable étant donné que le pouvoir bactéricide d'un colorant semble lié à sa basicité. Cette propriété de la réaction du milieu a été signalée par de nombreux auteurs. « D'après Eggerth, Prowazek (1910), aurait été le premier à constater que le pouvoir antiseptique de certains colorants vis-à-vis des protozoaires, augmente si le milieu est alcalinisé » (Serra). Puis Browning, Kennaway, montrent l'influence de l'alcalinité sur l'action infertilisante et microbicide du vert brillant, Michaelis et Derbny sur les dérivés de la quinine. Stearn et Stearn, étudiant les facteurs de l'antisepsie, s'attachent à l'effet du PH des colorants acides et basiques.

Eggerth a résumé l'opinion des différents auteurs en disant que le pouvoir antiseptique des colorants basiques croît quand le PH s'élève.

3° La lumière. — La lumière par elle-même peut exercer des actions empêchante ou microbicide sur les germes. Certains colorants par leur action seule sont également doués de cette propriété. Mais généralement ces deux facteurs sont employés simultanément. De nombreuses recherches ont cependant été effectuées pour montrer la part qui appartient à chacun. Leur association, comme l'ont montré différents auteurs (Von Tappeiner, Perrin, Wurmser, Serra), active le pouvoir antiseptique des colorants. En effet, l'exposition à la lumière de certains de ceux-ci, accroît leur propriété par réaction chimique ou par phénomène physique, la lumière fournissant dans ce dernier cas aux molécules des colorants une certaine quantité d'énergie qui lèserait les corps microbiens, préparant l'action ultérieure de la lumière.

4° La structure des colorants, c'est-à-dire la présence dans leur constitution de certains atomes, tels que C.N.O.S. Cette question est très complexe et nous ne nous y engageons pas.

L'emploi des matières colorantes en thérapeutique est l'objet d'une étude approfondie dans laquelle il faut faire intervenir les propriétés physiques et chimiques de ces substances et les facteurs influençant leur action.

L'action antiseptique

Au sens étymologique du mot, « antiseptique » veut dire qui prévient la putréfaction. C'est donc la propriété de tout corps qui empêche le développement microbien. La substance mise au contact de germes peut ou bien se montrer indigérent, ou stimuler la nutrition, ou au contraire entraver son développement. Dans certains cas la substance agit d'elle-même sans question de plus ou de moins, dans d'autres il faut doser les apports pour voir apparaître un effet. C'est ainsi que le formol à très faible dose est bien toléré par les microorganismes, et qu'à dose plus forte il se montre incompatible avec la vie microbienne. C'est donc le problème de la diversité des antiseptiques. En effet, lorsqu'une substance se trouve dans des conditions qui font d'elle un antiseptique, cette propriété se trouve à des échelons divers, soit qu'on n'obtienne qu'un ralentissement du développement, soit que le développement se trouve totalement arrêté, soit qu'on arrive à la mort des germes. La substance se comporte de deux façons selon qu'on ajoute aux milieux de culture des doses moyennes ou fortes d'antiseptiques et on obtient :

1° L'action empêchante, encore appelée infertilisante, produite lorsque le facteur influençant la biologie du germe, la concentration en substance antiseptique, a assez d'intensité pour empêcher sa multiplication. Cette propriété ne s'exerce plus lorsque le facteur cesse d'agir, et le microbe se redéveloppe normalement.

2° L'action microbicide ou bactéricide qui se manifeste lorsque le facteur agit d'une telle façon qu'il provoque la mort des microbes, ceux-ci ne pouvant plus se reproduire avec la disparition de la cause.

C'est ce qui se passe à diverses concentrations dans lesquelles on distingue des concentrations infertilisantes et des concentrations mortelles. Depuis longtemps on a mis en évidence cette action des antiseptiques sur le ralentissement de la vie microbienne : Kossiakoff en 1887, Geppert en 1889, Wassezuger en 1889, ont publié les modifications des fonctions des germes au contact de ces substances. Plus tard une différenciation fut faite entre ces deux pouvoirs. La première s'obtient en ajoutant assez d'antiseptique pour arrêter la multiplication bactérienne sans produire de grosses modifications morphologiques du germe qui, transporté en terrain favorable, doit encore posséder la propriété de se reproduire normalement : c'est en somme l'amener à l'état de vie latente, de vie ralentie. La seconde doit aboutir à la mort de la plastide sans susceptibilité de croissance après réensemencement.

La question des doses joue un rôle prépondérant, et il en est pour les colorants comme pour les autres antiseptiques, à l'égard des germes pour lesquels ils sont doués d'électivité. L'action de la matière colorante peut s'exercer au bout d'un temps très court, il s'agit d'une fixation chimique. Hugounencq écrit que la « vitalité des microbes après un contact peu prolongé et en solution faible ne semble pas atteinte. Quand le contact du microbe et de la couleur se prolonge, si la solution se concentre, non seulement la virulence, mais encore la vitalité du germe sont frappées » et dans ce cas les tentatives de réensemencement restent infructueuses.

Mais l'action antiseptique des matières colorantes, comme celle d'autres agents employés dans le même but, n'a pas un sens intégral. Un colorant peut se montrer antiseptique pour tel microbe alors que pour d'autres il n'aura aucune influence. Dans une autre branche que les

colorants, on connaît bien l'action du nitrate d'argent sur l'*aspergillus niger*, tandis qu'il laisse indifférents de nombreux autres germes. Cette spécificité d'actes est en relation avec la constitution des colorants et celle du germe.

Avec la découverte quotidienne de nouveaux colorants, l'intérêt de leur étude ne fait que croître. Peut-être prendront-ils place dans l'atténuation des germes. Aujourd'hui ils sont employés, certains du moins, dans le traitement de maladies parasitaires et de quelques maladies microbiennes. On les emploie également en milieux électifs pour le diagnostic de certaines espèces microbiennes.

CHAPITRE IV

Recherches personnelles

La contribution que nous apportons à l'étude des matières colorantes employées comme substances thérapeutiques n'a pas pour ambition de vouloir contrôler les expériences et les conclusions faites par des auteurs plus qualifiés que nous en la matière. Cependant si nous avons abordé une expérimentation délicate et une technique ardue, c'est que nous avons voulu prouver à nos maîtres que nous portions un grand intérêt à la science qu'ils nous ont enseignée, et ainsi par ce modeste travail leur rendre un hommage plein de gratitude et de respect. De plus, les conseils qu'ils nous ont prodigués, la liberté qu'ils nous ont tolérée dans leurs laboratoires, nous a permis de nous familiariser quelque peu avec le matériel bactériologique que nous serons appelé à utiliser chaque jour dans la carrière militaire que nous avons choisie. C'est en remerciements à leurs conseils bénévoles que nous avons entrepris d'étudier, dans l'antisepsie, l'action de quelques matières colorantes.

En médecine vétérinaire le praticien est appelé à rencontrer dans sa clientèle de nombreuses maladies infectieuses frappant toutes les espèces ; dans l'armée, le vétérinaire peut avoir à lutter contre ces mêmes maladies atteignant l'effectif équin dont il a la garde sanitaire. Parmi elles nous avons particulièrement en vue celles dont le traitement à ce jour est nul ou dépend simplement de la sérothérapie, et nous avons voulu étudier sur les agents de quelques-unes l'action de médicaments chimiques,

principalement des colorants. La chromothérapie peut-elle donner des médicaments capables d'amener la guérison des organismes infectés dès que le diagnostic est posé ? Dans ce travail nous n'étudierons qu'*in vitro* l'action de quelques colorants. Nous avons utilisé des produits dont l'action s'est révélée certaine à l'égard d'autres germes que ceux avec lesquels nous nous proposons d'expérimenter. Tous les germes ne réagissent pas de la même façon au contact d'un même antiseptique, mais nous savons aussi qu'un même antiseptique peut se montrer efficace à l'égard de plusieurs microbes ou parasites.

Nous avons dit de plus que c'était surtout dans les colorants basiques que nous trouvions le plus grand nombre d'antiseptiques, mais que toutefois les colorants acides pourvus de groupements qui leur confèrent la toxicité pour les éléments sur lesquels ils se fixent, sont doués du pouvoir microbicide ou parasiticide.

En somme nous avons expérimenté avec des substances qui se sont montrées efficaces dans le traitement des parasites du sang et nous avons essayé de voir si ces médicaments parasitocides étaient doués des mêmes propriétés à l'égard des bactéries. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre les produits suivants :

Violet de gentiane
Fuchsine
Trypanbleu

auxquels nous avons ajouté, quoique n'étant pas des colorants, mais qui se rattachent cependant au problème par leur action parasiticide et les travaux français auxquels ils ont donné lieu :

le Moranyl pour la médecine humaine,
le Naganol pour la science vétérinaire.

Technique expérimentale

Toute recherche a besoin d'être soigneusement préparée. Aussi avons-nous cherché, dans notre expérimentation, à apporter les plus grands soins d'asepsie afin d'éviter toute contamination accidentelle, à diminuer au minimum les causes d'erreur possible par l'emploi d'un matériel bien connu. Nous avons étudié l'action des produits précités sur :

la bactériodie charbonneuse,
le bacille du rouget,
le paratyphique.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS. — Nous avons employé pour notre travail des solutions de produits à 1 % dans l'eau distillée. Pensant que ces substances pouvaient être modifiées pendant leur stérilisation à l'autoclave, nous les avons filtrées sur bougies I5, exception faite pour la fuchsine qui, possédant des micelles trop gros, l'a été sur bougie I2.

Ces solutions ont été ensuite portées à l'étuve à 37° pour contrôler leur stérilité, et y ont été laissées jusqu'aux essais.

RÉPARTITION EN TUBES DE BOUILLON ET GÉLOSE. — Les tubes de bouillon préparés à l'avance et absolument stériles (10 cc. de bouillon) furent ensuite colorés par série de 5, à raison de 1/10, 2/10, 3/10, 4/10 et 5/10 de centimètre cube de chaque colorant, lesquels furent répartis à l'aide de pipettes stériles au-dessus d'un bec Bunsen. Nouvelle mise à l'étuve.

Nous avons opéré de même pour les tubes de gélose préalablement fondue au bain-marie.

CULTURES. — La culture n'est pas le type de vie normal des bactéries dans la nature. Cependant en bactériologie on ne peut parler de réaction à l'égard d'un germe que si l'on prend pour point de départ une culture pure. D'autre part on sait que la résistance d'une culture bactérienne aux divers agents physiques et chimiques suit une graduation suivant la jeunesse ou, au contraire, la vieillesse des germes qui le composent. Un germe en effet n'est pas toujours semblable à lui-même : il est plus délicat lorsqu'il sort de l'œuf, c'est-à-dire de la spore, que lorsqu'il a déjà quelque durée d'existence. On peut avoir également une faiblesse héréditaire du microbe suivant la souche dont il provient ; des bactéries provenant de terrains différents, peuvent montrer des degrés de résistance vis-à-vis d'un antiseptique. C'est pourquoi nous avons utilisé des produits :

1° de virulence certaine,

2° de durée d'existence en culture identique, car il fallait travailler, non sur une population diversifiée, mais sur un ensemble d'individus semblables.

Les microbes utilisés provenaient de cultures pures de 24 heures, entretenues par repiquages quotidiens et placées à l'étuve jusqu'à l'essai.

En même temps nous avons expérimenté à la température optima de développement pour éviter de nous trouver en période de vie latente du microbe, ce qui aurait pu fausser les résultats.

Les bactéries ont été cultivées sur gélose ordinaire, provenant toutes de cultures du même âge : 24 heures, car on se doute que par exemple des cultures de 15 heures ne réagiraient pas comme des cultures de 15 jours.

MISE EN SUSPENSION. — Pour réaliser les émulsions microbiennes nous avons recouvert les cultures d'un liquide dispersif, en la circonstance l'eau distillée, et nous avons arraché les particules microbiennes par des mouvements du tube.

ENSEMENCEMENT DES TUBES.

A. *Bouillon*. — Opérant en atmosphère calme, les tubes bouchés le plus horizontalement possible, nous avonsensemencé chaque série de 5 tubes à l'aide des émulsions ainsi préparées et en employant des pipettes stériles.

B. *Gélose*. — Dans les mêmes conditions d'aseptie nous avonsensemencé les tubes de gélose à l'aide d'anses de platine.

Lesensemencements ainsi effectués furent portés à l'étuve à 37°.

CONTROLE DES RÉSULTATS.

Au bout de 24 heures les cultures étaient positives pour toutes les substances employées et ajoutées à raison de 1/10 de centimètre cube. Résultats identiques pour 2 et 3/10. A partir de 4/10, on note pour le violet de gentiane et la fuchsine une diminution dans l'étendue de la culture, alors que pour les autres l'aspect est identique à celui des faibles doses.

Pensant, conformément à l'opinion de certains auteurs, particulièrement de Hugounencq, que l'actif de l'antiseptique pouvait se marquer après une certaine durée de contact, nous avons replacé les tubes à l'étuve et 36 heures après un nouvel examen a été pratiqué qui nous a donné les mêmes renseignements que pour 24 heures.

Après 48 heures le développement se poursuit, sauf dans les tubes 4 et 5 de fuchsine et violet où le développement se stabilise.

Continuant nos observations après différentes durées de contact, nous avons constaté qu'aux plus fortes concentrations les microbes marquent un arrêt de développement dans le violet de gentiane et la fuchsine. Aux autres taux la croissance microbienne se poursuit. Dans les autres antiseptiques et à tous les taux les germes continuent à se reproduire.

Nous pouvons résumer les résultats obtenus dans les tableaux ci-dessous.

Après 24 heures et 36 heures

	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10
Moranyl.....	+	+	+	+	+
Naganol	+	+	+	+	+
Trypan bleu.....	+	+	+	+	+
Fuchsine	+	+	+	Cultures positives mais moins abondantes	
Violet de gentiane.....	+	+	+		

Après 48 heures et plus

	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10
Meranyl	+	+	+	+	+
Naganol	+	+	+	+	+
Trypan bleu.....,	+	+	+	+	+
Fuchsine	+	+	+	Arrêt de développement de cultures	
Violet de gentiane.....	+	+	+		

Certes notre travail n'est pas à l'abri des objections, notamment quant à la question des volumes microbiens ajoutés à nos milieux colorés. En effet, pour pouvoir porter un jugement, il faut que les apports microbiens

dans chaque milieu soient identiques et c'est pourquoi nous avons fait notre possible pour nous rapprocher le plus près possible de la réalité. Nous avons en effet ajouté à des quantités égales de milieu des doses presque équivalentes de corps microbiens en utilisant, comme modes de véhicules, des pipettes semblables à raison de une goutte de produit virulent par tube, et pour la gélose nous avons eu recours à l'anse de platine comme unité. Ayant employé des émulsions de microbes, nous pouvons supposer que les différences de numéralité microbienne ne sont pas tellement étendues qu'il faille utiliser les méthodes photométriques d'évaluation de la densité microbienne.

Quelles conclusions pouvons-nous tirer de ces expériences *in vitro* ? C'est que :

1° Le pouvoir antiseptique des colorants croît avec la concentration du milieu ; si la solution se concentre, la vitalité du germe est atteinte ; en solution faible celle-ci n'est pas touchée.

2° La durée de contact est un facteur influençant la propriété microbicide. Quand le contact du germe et du colorant est de courte durée, il n'y a aucune modification dans le développement microbien ; au contraire, quand le contact se prolonge, la croissance microbienne est influencée et la vitalité des microorganismes se trouve atteinte.

3° Nous nous étions proposé de voir s'il existait des rapports entre l'action parasiticide et l'action microbicide des médicaments. Dans ce but nous avons employé des substances actives contre les parasites, à savoir le moranyl, le noganol et le trypan bleu. Il résulterait de ce que nous avons obtenu que les médicaments parasitocides ne sont pas forcément bactéricides. Mais nous n'avons expérimenté qu'*in vitro* et nous savons qu'il existe des substances chimiques qui n'agissent sans action *in vitro* et très actives *in vivo* (exemple : l'atoxyl, qui n'exerce son activité sur les trypanosomes que quand il est introduit dans l'organisme infesté). C'est donc que les choses ne

se passent pas dans l'organisme comme dans les tubes du laboratoire et qu'il se forme au contact des cellules du premier, un corps nouveau, complexe et actif.

Il faudrait donc pour pouvoir porter un jugement définitif contrôler ces résultats par des injections *in vivo*. Le temps nous a manqué pour nous permettre d'effectuer de nouvelles recherches dans cette voie. C'est un travail que nous nous proposons de faire quand nous aurons acquis une expérience plus grande et quand nous aurons à notre disposition le matériel nécessaire.

Weisner en étudiant le pouvoir antiseptique du kristall-violet sur la bactériodie charbonneuse a montré la nécessité de ce contrôle sur le vivant, car on ne peut conclure à la mort des germes ainsi traités, même si les réensemencements se sont montrés négatifs, que quand on les a introduit dans l'organisme sans y provoquer de perturbations.

CHAPITRE V

Des applications de la chromothérapie aux maladies des animaux

L'expérimentation seule permet de se rendre compte de la valeur des antiseptiques internes ; mais elle ne peut se faire que sur des animaux auxquels il est possible de transmettre la maladie et grâce à elle on a pu utiliser les matières colorantes comme agents thérapeutiques. Mais jusqu'à ce jour les meilleurs résultats obtenus en chromothérapie le furent sur des maladies à protozoaires. D'où vient donc que dans les affections bactériennes ces médicaments n'ont pas donné de résultats meilleurs ? Ceci provient de la structure totalement différente existant entre les microorganismes des deux règnes. Les bactéries, en effet, comme toutes les cellules végétales, sont enveloppées d'une membrane périphérique qui se distingue nettement du reste du germe et qui en limite le contour ; cette membrane est résistante et est de nature variable suivant les espèces : tantôt elle est cellulosique, chez d'autres elle ressemble à de la chitine, ou encore elle peut être de consistance grasse ou cireuse (B. de Koch). De plus leur protoplasma peut être considéré comme réparti uniformément à l'intérieur. Elles sont douées d'une vitalité extraordinaire et dans les états infectueux elles vivent dans la profondeur des cellules composant le tissu animal, cellules plus fragiles et plus sensibles que les microbes eux-mêmes.

Les protozoaires, au contraire, bien qu'étant des êtres unicellulaires, sont adaptés à toutes les exigences de la vie, et ils possèdent à un degré moins élevé sans doute les propriétés des animaux supérieurs. Un ancien savant ne disait-il pas que ces êtres possédaient en petit les organes des animaux supérieurs. Nous n'irons pas jusque là, mais il n'en est pas moins vrai qu'ils présentent les fonctions de la vie animale : ils digèrent leur nourriture dans leurs vacuoles et rejettent les déchets au moyen de vésicules. De plus les protozoaires n'ont pas de membranes aussi différenciées que les bactéries et offrent par conséquent une résistance beaucoup moins grande à l'action du médicament de par leur structure protoplasmique plus différenciée, ce qui les rend plus sensibles et plus vulnérables. Cette dissemblance dans leur structure explique pour une part pourquoi les résultats obtenus par les mêmes moyens d'action mis en œuvre contre ces deux sortes de germes sont si différents.

Cette divergence des effets thérapeutiques produits par les colorants est liée aussi à d'autres causes. Le dosage de la substance doit être en effet plus élevé pour atteindre les organismes plus résistants que sont les bactéries. Supposons par exemple que deux agents microbiens A et B, l'un du règne végétal, l'autre du règne animal, soient sensibles à une même matière colorante X ; les expériences relatives à ce sujet montrent qu'il faut une dose plus forte de la substance pour tuer le premier, alors qu'une dose notablement plus faible produira le même résultat sur le second. Dans ces conditions on se rapproche plus de la dose toxique pour l'organisme qu'on veut guérir dans un cas que dans l'autre, et parfois même il faudrait, pour lutter efficacement contre les bactéries, administrer des doses telles que le médicament deviendrait un poison. C'est un élément dont il faut tenir compte, étant donné que certains organismes présentent des réactions de sensibilité très différentes. Dans le milieu vivant qu'ils habitent, bactéries et protozoaires se com-

portent diversement quand on y introduit un médicament et des doses parfaitement tolérées par l'organisme sont actives contre le parasite animal alors qu'elles sont sans action sur l'autre. Il faut, en effet, toujours compter sur la toxicité d'un médicament suivant la quantité injectée comme c'est le cas de la strychnine qui employée à petites doses est un stimulant, mais qui, à doses élevées, devient un poison mortel. Les colorants n'échappent pas à cette règle et leur toxicité ne doit pas être mise en doute.

D'autre part, le siège des bactéries dans l'organisme est beaucoup plus diversifié suivant leur nature, leur mode de vie, que ne l'est celui des parasites animaux. Elles donnent naissance à des syndromes locaux ou généraux suivant qu'elles se localisent en un endroit du tégument cutané ou à un organe, ou alors qu'elles se répandent dans l'organisme entier à la faveur des voies pulmonaires, digestive, circulatoire, d'une plaie. On conçoit que le problème de leur thérapeutique se heurte à de grosses difficultés tenant à l'impossibilité de les atteindre, à l'emploi de voies d'accès au cours desquelles le médicament se trouve modifié ou éliminé avant d'avoir pu se montrer actif. Les protozoaires, eux, sont trouvés pour la plupart dans le sang ou les humeurs des animaux et sont directement ou facilement accessibles.

On se heurte encore à la résistance microbienne vis-à-vis des médicaments quand les doses employées dès le début du traitement ont été trop faibles : c'est ainsi que l'on a obtenu des races de trypanosomes résistantes au trypan rouge ; le gros écueil, c'est que cette résistance s'exerce à l'égard de toutes les substances du groupe, c'est-à-dire que les couleurs dérivées de la benzidine, cependant différentes du trypan rouge, seront sans action sur ces races.

Ainsi la différence de structure entre bactéries et protozoaires, la toxicité des produits, les localisations, l'accoutumance, nécessitent un traitement rapide qui n'est pas sans danger, un dosage sévère des produits, une médica-

tion combinée permettant de faire sortir les germes de leurs cachettes (adrinaline-uroformine) ou pour accroître la perméabilité des membranes et cellules, une médication alternée pour éviter les phénomènes d'accoutumance.

La chimie a fourni des colorants qui, en médecine vétérinaire se sont montrés de bons agents thérapeutiques dans le traitement de maladies à protozoaires. Nous citerons quelques affections dans lesquelles la chromothérapie a justifié sa place en thérapeutique.

Les trypanosomiasés équine, bovine, canine sont justifiables du traitement par le trypan rouge et le trypan bleu, employés en injections sous-cutanées ou intra-veineuses.

L'Acridine par les mêmes voies a été aussi employée avec plus ou moins de succès. Mais elle doit être employée avec prudence, car elle provoque des accidents de photosensibilisation.

Quelques colorants dérivés du triphénylméthane se sont montrés trypanocides *in vivo* : le vert brillant, le vert malachite, les fuchsines (typarosane).

Contre les Piroplasmoses il est un colorant qui exerce une action indiscutable et qui est encore à l'heure actuelle le seul médicament contre ces affections : c'est le trypan bleu de Nicolle et Mesnil. Il exerce par fixation une action directe sur les piroplasmes. Mais il n'est pas à l'abri de certains reproches : administré à doses insuffisantes pour désinfecter l'organisme d'un seul coup, il confère aux parasites la propriété de pouvoir s'habituer à son action tout en laissant les individus malades dans une sorte d'immunité, les atteints ne présentant plus de symptômes aigus de la maladie. De plus il ne frappe pas toutes les espèces de piroplasmes et laisse *piroplasma argentinum* (bovins), *piroplasma divergens* (bovins), *Nuttallia equi* (cheval), *piroplasma gibsoni* (chien), insensibles à son action. Son emploi nécessite un diagnostic sûr du parasite en cause.

Malgré ces inconvénients, le trypan bleu est le seul remède ayant de l'efficacité contre la plupart des piroplasmes. Il est employé en injections sous-cutanées autour

des piqûres de tique et intra-veineuses à la dose de 1 gr. 5 à 2 grammes en solutions à 1,5 ou 2 %.

Dans un but prophylactique il est injecté dans un but préventif aux animaux susceptibles d'infestation.

Mais l'injection est suivie d'une coloration bleue de tout l'organisme, coloration qui disparaît plus ou moins rapidement et qui peut être un échec lorsque les animaux sont destinés à la boucherie.

Un autre produit assez actif contre les Typanosomes et les piroplasmes est l'afridol violet, dérivé du groupe de l'urée.

Dans le domaine des maladies infectieuses les colorants n'ont pas encore fourni leurs preuves.

En applications locales les Anglais ont employé pendant la guerre sous forme de pulvérisations et de compresses sur les plaies le vert brillant et le vert malachite seuls ou associés au mercure. ,

On connaît aussi le pouvoir antiseptique du bleu de méthylène et son utilisation sur les plaies. De même celui de la trypaflavine, dérivée de l'acridine, et son emploi identique.

Traitement interne. — En ce qui concerne le traitement profond des maladies bactériennes, la chromothérapie n'a donné que peu de médicaments. Toutefois, en se basant sur les résultats obtenus en médecine humaine par les injections de gonacrine contre certaines gonorrhées, on peut espérer découvrir des matières colorantes thérapeutiques pour le traitement de nos animaux où le champ de l'expérimentation est plus étendu.

Des résultats encourageants ont été obtenus par Morgenroth par l'emploi d'un dérivé de l'acridine, le rivanol, dans le traitement des mammites streptococciques.

Des essais de traitement de l'avortement épizootique des bovidés par des injections de gonacrine ont donné des résultats plus ou moins heureux. Toutefois on ne peut

porter un jugement définitif sur cette substance qui n'est encore qu'au stade de l'expérimentation.

Ainsi les résultats obtenus par la chromothérapie sont assez encourageants pour prévoir de nouvelles recherches sur le pouvoir thérapeutique des colorants au profit de la médecine.

CHAPITRE VI

Applications des matières colorantes en bactériologie

Dans ce chapitre, nous avons en vue les applications des matières colorantes en tant que substances colorées. Bien que n'entrant pas dans le cadre du sujet que nous nous étions proposé, nous n'avons pas voulu passer sous silence les grands services que rendent chaque jour les colorants en bactériologie, science qui fait partie intégrante de l'art vétérinaire.

Les matières colorantes avant leur utilisation en thérapeutique étaient d'abord dans le domaine industriel sujettes à un grand emploi. Elles furent ensuite appliquées en histologie à la coloration des coupes et à l'étude des tissus, et c'est plus tard encore qu'elles trouvèrent place en bactériologie. Dans cette branche elles ont joué un rôle important en permettant, associées au microscope, de découvrir et d'étudier les microbes, et aujourd'hui elles sont utilisées dans la recherche du diagnostic de certaines maladies.

Nous ne ferons que citer quelques applications de ces substances colorantes, celles qui sont du domaine courant.

COLORATION DES PRÉPARATIONS. — On sait que tous les microbes ne sont pas sensibles aux mêmes colorants et on dit par exemple d'un microbe qu'il prend le Gram ou qu'il prend le Ziehl. Nous énumérerons ici les trois principales méthodes de coloration, celles qui sont employées le plus fréquemment.

Méthode de Gram. — Fixer la préparation, puis :

- 1° Colorer par le violet de gentiane ;
- 2° Laver pour enlever l'excès de colorant après un court contact ;
- 3° Mordancer par le Lugol pendant une minute environ ;
- 4° Laver à grande eau ;
- 5° Différencier par l'alcool-acétone.

Méthode de Ziehl. — Fixer la préparation,

- 1° La recouvrir de fuchsine phéniquée et la déposer sur une plaque chauffante en évitant l'ébullition et l'évaporation complète ;
- 2° Laver à l'eau distillée ;
- 3° Ajouter quelques gouttes d'acide azotique au 1/3, ou d'acide sulfurique au 1/4. Laisser en contact une minute environ ;
- 4° Laver à grande eau ;
- 5° Verser de l'alcool absolu et sécher.

Méthode de Giemsa. — Elle consiste à verser sur la préparation préalablement disposée dans une boîte de Petri, 10 gouttes de colorant Giemsa R A L ; on laisse agir quelques secondes, puis on ajoute autant de centimètres cubes d'eau distillée neutralisée (bouillie) que de gouttes de colorant. On laisse en contact pendant trente minutes, on lave et on sèche.

EMPLOI COMME INDICATEURS DE P H. — Cette utilisation des colorants est basée sur ce que certains d'entre eux changent de teinte sous l'action d'une variation d'acidité. Le virage s'effectue entre des limites de P. H. bien déterminées pour chaque colorant. Ces indicateurs présentent en général deux virages : acide et alcalin avec des séries de teintes intermédiaires correspondant à une valeur de P. H. entre les deux extrémités. Le tournesol, le rouge neutre, la phénol phtaléine ont été employés par exemple (gélose lactosée tournesolée, petit lait tournesolé, eau peptonée rouge neutre...) ; le bromothymol a été employé

également pour le diagnostic de mammite chez les vaches laitières.

EMPLOI COMME MILIEUX ÉLECTIFS. — Certains colorants ajoutés à des milieux de culture ont la propriété d'exercer sur les germes un pouvoir inhibiteur qu'ils n'ont pas à l'égard de quelques-uns d'entre eux. C'est en se basant sur ce pouvoir que l'on arrive à obtenir des cultures pures de bacilles déterminés ou à mettre en évidence dans des produits pathologiques qui contiennent plusieurs espèces microbiennes celle que l'on croit être l'agent de la maladie.

Ces milieux sont d'une certaine efficacité dans le diagnostic de quelques affections; ils sont précieux en inspection des viandes pour dépister les bacilles carnés et supprimer les intoxication alimentaires d'origine carnée, et aussi pour la recherche du bacille d'Eberth dans les eaux contaminées.

De nombreux milieux électifs sont utilisés, mais nous n'en citerons que quelques-uns qui sont d'une application courante au laboratoire.

Bacille typhique - Paratyphiques - Colibacille

1. — Gélose de Löffler au vert malachite: dont le principe est constitué par l'action inhibitrice du vert malachite sur les autres microorganismes et donnant avec ces microbes des cultures de teintes différentes:

Colonies bleues transparentes pour le bacille typhique;
Colonies rouges, opaques pour le colibacille.

2. — Milieu de Digralski-Conradi au krystall-violet: donne des colonies bleues transparentes de bacille d'Eberth.

3. — Milieu d'Endo à la fuchsine, lactose et hyposulfite de soude:

Colonies incolores ou légèrement rosées pour le bacille typhique;

Colonies rouges de colibacille.

4. — Milieu de Conradi au vert brillant et à l'acide

picrique. Il constitue surtout un milieu d'enrichissement pour le bacille typhique et les paratyphiques. Le coli ne s'y développe pas.

5. — Milieu de Verge et Thieulin au vert brillant sur lequel se développent uniquement les microbes des genres typhique et paratyphique. Les colonies sont abondantes. Le coli ne s'y développe pas bien et produit une réduction très lente du milieu.

Bacille tuberculeux

Milieu de Pétroff: sur lequel on fait des cultures de bacilles de Koch provenant de produits souillés. Il se base sur l'action inhibitrice du violet de gentiane sur les autres germes. Ajouté dans la proportion de 1/10.000, seul le bacille tuberculeux s'y développe.

Brucella bovis, suis, *melitensis*

Milieus de Huddleson. Huddleson a employé pour la différenciation de ces trois germes quatre milieux colorés :

- 1° à la thionine à 1/30.000,
- 2° à la fuchsine basique à 1/25.000,
- 3° au violet de méthyl à 1/100.000,
- 4° à la pyronine à 1/200.000.

Le type porcin: *Brucella abortus* suis ne se développe que sur le milieu à la thionine.

Brucella abortus bovis sur les trois autres seulement.

Quant à *Brucella melitensis* il est réfractaire sur tous les milieux.

Des auteurs étrangers ont également constitué des milieux à base de bromocrésol, de lait et de bleu de méthylène pour le streptocoque des mammites.

Les colorants en bactériologie ont donc un rôle de premier plan qui à lui seul mériterait d'attirer l'attention des expérimentateurs.

CONCLUSIONS

De merveilleux remèdes biologiques surpassant en spécificité et en efficacité les meilleurs médicaments chimiques ont été découverts à l'égard de maladies à germes bien connus : ce sont les vaccins et les sérums. Mais il reste encore un grand nombre de maladies infectieuses qui ne sont pas justiciables de ces méthodes et contre lesquelles les médications chimiques sont d'un grand secours. C'est ce qui a fait dire au docteur Burnet : « Rien ne dit qu'il n'existera pas une médication chimique des infections bactériennes, et que nos vaccins et sérums d'aujourd'hui, trouvailles merveilleuses d'un empirisme très savant, ne cèderont pas la place à des remèdes physico-chimiques mieux définis et plus mécaniques. » Et à Debucquet : « Si nous subordonnons une grande part de l'activité thérapeutique aux propriétés physico-chimiques, il n'est pas interdit de penser que les colorants pourront trouver un jour une place dans la chimiothérapie des affections microbiennes. »

« C'est de la chimie que l'on attend de nouveaux progrès dans l'art de guérir. »

Nos conclusions n'ont pas la prétention d'apporter une solution à cette question, elles ne font que confirmer pour quelques agents de la thérapie chimique ce principe qu'il n'existe aucune relation préétablie entre l'activité parasiticide *in vivo* et l'action bactéricide *in vitro*.

Vu : le Doyen,
BALTHAZARD.

Vu : le Président de la Thèse
LCEPER.

Vu et permis d'imprimer,

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- BESSON. — *Technique microbiologique.*
- BRIDE. — Sur le pouvoir antiseptique de quelques couleurs d'aniline. *Ann. I. P.*, 1921.
- BURNET. — *Microbes et toxines.*
- DEBUCQUET. — *Les principaux colorants employés en thérapeutique.*
- DUCLAUX. — *Traité de microbiologie.*
- FLORENCE. — *La thérapeutique moderne.*
- HUGOUNENCO et ERAUD. — Action de certaines matières colorantes dérivées de la houille sur le développement et la virulence de quelques germes. *C. R. Soc. Biol.*, 1891.
- KOSSIAKOFF. — Accoutumance des microbes aux antiseptiques. *Ann. I. P.*, 1897.
- KRIEGLER. — *Action de quelques couleurs d'aniline sur quelques microbes.*
- LAUGERON. — *Précis de microscopie.*
- LEGRAIN. — Contribution à l'étude de la culture des bactéries sur milieux colorés. *Ann. I. P.*, 1891.
- NICOLAS. — *La chimiothérapie.*
- SERRA. — *Pouvoir bactéricide des matières colorantes dérivées du triphénylméthane.*
- SISLEY, PORCHER et PANISSET. — De l'action de quelques microbes sur quelques types de matières colorantes. *C. R. Ac. des Sc.*, 1911.
- VERGE. — Les toxi-infections alimentaires d'origine carnée. *Recueil d'Alfort*, 1931.
- VERGE et THIEULIN. — Milieu au vert brillant. *C. R. Soc. Biol.*, 1931.
- WEISNER. — Sur le pouvoir antiseptique du cristal violet. *C. R. Soc. Biol.*, 1926.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
CHAPITRE PREMIER. — <i>La chimiothérapie</i>	9
CHAPITRE II. — <i>Du choix des matières colorantes par l'expérimentation</i>	15
CHAPITRE III. — <i>Du mécanisme d'action des matières colorantes</i>	23
Constitution générale des colorants	23
Mécanisme	24
L'action antiseptique	28
CHAPITRE IV. — <i>Recherches personnelles</i>	31
Technique expérimentale	33
CHAPITRE V. — <i>Des applications de la chromothérapie aux maladies des animaux</i>	39
CHAPITRE VI. — <i>Application des matières colorantes en bactériologie</i>	45
CONCLUSIONS	49
BIBLIOGRAPHIE	51

